

## МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОСТАНОВКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

ПОБЯРЖИН В.В.<sup>1</sup>, ПАШИНСКАЯ Е.С.<sup>1</sup>, СЕМЕНОВ В.М.<sup>1</sup>, ГОНЧАРОВ А.Е.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, г. Минск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2018. – Том 17, №6. – С. 32-45.

## METHODOLOGICAL ASPECTS OF SETTING UP ONCOLOGICAL MODELS UNDER EXPERIMENTAL CONDITIONS

PABIARZHYN V.V.<sup>1</sup>, PASHINSKAYA E.S.<sup>1</sup>, SEMENOV V.M.<sup>1</sup>, HANCHAROU A.Y.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Republican Practical-Scientific Centre of Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus.

Vestnik VGMU. 2018;17(6):32-45.

### Резюме.

Организм состоит из миллионов клеток, каждая из которых обладает определенными функциями. Нормальные клетки растут, делятся и умирают в определенной закономерности. Этот процесс контролируется организмом на молекулярно-генетическом уровне. Скорость деления клеток различна в разных органах и тканях. В тех случаях, когда структура клеток меняется под воздействием различных факторов, клетки делятся бесконтрольно, с последующей миграцией за пределы своих обычных границ в другие органы и ткани. Там они формируют опухоли или остаются на стадии метастазов. Почти все опухоли развиваются в нормальных тканях, но чаще всего в тех, в которых скорость деления клеток выше.

По распространенности раковых заболеваний лидируют: рак легких, рак желудка, рак толстой кишки, рак печени, рак молочной железы, яичников и шейки матки.

Несмотря на то, что рак как онкозаболевание известно достаточно давно, его экспериментальное воспроизведение – трудный и многостадийный процесс. Воспроизведение злокачественного процесса в лабораторных условиях *in vivo* и *in vitro* отмечено в научной литературе как крупное научное достижение. Моделирование онкологических процессов в эксперименте с использованием новейших достижений науки, медицины и техники даст возможность выяснить причины возникновения и патогенеза опухолевого процесса, разработать методы его профилактики и лечения.

*Ключевые слова:* рак, животные, модель, клеточные культуры, перевивка, человек, опухоли.

### Abstract.

The body consists of millions of cells, each of which has certain functions. Normal cells grow, divide and die in a certain conformity. This process is controlled by the body at the molecular-genetic level. The rate of cell division is different in various organs and tissues. In those cases where the structure of cells varies under the influence of different factors, cells divide without control, with subsequent migration beyond their usual boundaries to other organs and tissues. There they form tumors or remain at the stage of metastases. Almost all tumors develop in normal tissues, but most often in those where the rate of cell division is higher.

According to the spread of cancer the following types are in the lead: lung cancer, stomach cancer, colon cancer, liver cancer, breast, ovarian and cervical cancer.

Despite the fact that cancer, as an oncological disease, has been known for a rather long time, its experimental simulation is a difficult and multistage process. Simulation of a malignant process in laboratory conditions *in vivo* and *in vitro* has been noted in scientific literature as an important scientific achievement. The modelling of oncological processes in the

experiment with the use of the latest achievements of science, medicine and technology will provide an opportunity to clarify the causes of the onset and pathogenesis of the tumor process, to elaborate methods of its prevention and treatment.

*Key words: cancer, animals, model, cell cultures, ligation, human being, tumors.*

В настоящий момент процент онкозаболеваемости непрерывно растет, причем от рака страдают не только люди, но и представители животного мира. В связи с этим онкологию, по нашему мнению, можно отнести в равной мере как к медицинским, так и биологическим наукам.

Появление новообразований – патологический процесс, который является результатом эпигеномного или мутационного изменения экспрессии генов-регуляторов клеточного деления, сопровождающийся неконтролируемым и потенциально неограниченным делением клеток. Для роста и развития онкоклеток в более объемные структуры – опухоли необходимо отсутствие реакции на действие кейлонов (тканеспецифичные гормоны местного действия, тормозящие пролиферацию клеток посредством ингибирования синтеза ДНК в клетках-предшественниках), за счет чего исчезает лимит Хейфлика. Такие изменения могут быть как наследственными, так и спонтанными или индуцированными.

На современном этапе исследования в области онкологии идут по экспериментальному и клиническому направлениям, которые взаимосвязаны. В экспериментальной онкологии используются как общебиологические методы и методики, так и специфические для решения определенных целей и задач. Выяснение и оценка роли в этиологии опухолей вирусов, простейших, гельминтов, ионизирующего излучения, канцерогенных веществ; изучение закономерностей опухолевого процесса опытным путем направлено, чаще всего, на достижение улучшения диагностики, лечения и профилактики рака у человека.

Целью настоящей статьи является систематизация базисных принципов, методов, методик, способов и средств воспроизведения онкомоделей в эксперименте для использования в научно-практической деятельности.

## История

Первые попытки экспериментального воссоздания опухолевого процесса датируются концом XIX – началом XX века и считаются значительным научным достижением. Так, русскими учеными И.М. Львовым и Н.Л. Петровым впер-

вые были проведены опыты по трансплантации опухолевых тканей в организм взрослого животного. Замечено, что на месте введения клеточных структур возникали конгломераты, напоминавшие тератомы, а в случаях, когда к пересаженной ткани добавляли канцерогенные вещества (мышьяк, индол, каменноугольная смола, 1,2,5,6-добензантрацен), образовывались злокачественные опухоли [1, 2, 3].

Немногим позже М.М. Руднев и его ученик М.А. Новинский впервые успешно гомотрансплантировали спонтанно возникшую опухоль собаке, а еще через 10 лет А.Н. Напав также экспериментально подтвердил возможность перевивки злокачественных опухолей.

Уже ко второй половине XX века была разработана методика перевивки опухолевых единиц в ткани с пониженной иммунной реактивностью (глаз, мозг, защечные мешки хомячков). Все это осуществлялось на фоне подавления иммунной системы ионизирующим излучением или введения кортизона.

В России к концу XIX века написано большое количество работ, в которых выдвинуты предположения об этиологии злокачественного роста, подкрепленные новыми экспериментально полученными морфологическими данными. Такие ученые, как И.М. Сеченов, С.П. Боткин и И.П. Павлов, на тот момент, оказали весьма масштабное влияние на развитие биологических и медицинских наук, проверяя различные многочисленные концепции происхождения злокачественных опухолей.

Профессором В.В. Подвысоцким впервые сделан вывод о том, что в происхождении рака имеют значение бластомогенные экзогенные химические вещества, что было подтверждено экспериментально. Он один из первых предложил и опробовал химиотерапевтическое лечение злокачественных опухолей, а также экспериментально опроверг теорию зародышевых зачатков Конгейма. Высказанная В.В. Подвысоцким мысль о полиэтиологической природе рака нашла свое подтверждение: «Не может быть одной, единой причины различных опухолей, так как избыточный рост тканей может быть вызван различными способами». Как материалист ученый выделял одно из наиболее определенных значений в про-

исхождении опухолей, а именно влияние эндогенных бластоматозных химических факторов, вызываемых клетками организма.

Интерес также представляют исследования, проведенные с 1908 по 1911 годы. Ученые V. Ellermann и O. Bang, а также Ф. Раус в ходе опытов по трансплантации сарком и лейкозов кур заметили, что некоторые из них перевиваются бесклеточным фильтратом. В свою очередь, в 1933 году Р. Шоуп описал процесс перевивки папилломы кожи от диких кроликов лабораторным. При анализе папилломного фильтрата был обнаружен биологический компонент, имевший ряд вирусных свойств.

Дж. Биттнер, изучавший рак молочной железы у мышей, так называемых раковых линий, выяснил, что существуют факторы передачи (например, фактор молока), характерные только для определенных млекопитающих. В целом, 20 век также знаменит открытием ряда вирусов лейкозов и их форм, а также ряда вирусов, способных вызывать различные опухоли (вирус полиомы или вирус SV40).

Немало времени уделено и разработке методов индукции канцерогенеза различными факторами и агентами, с помощью которых можно получить опухоль в эксперименте. G. Raulol-Lapointe, J. Clunet впервые вызвали возникновение саркомы у крыс с помощью рентгеновского излучения, а группа других ученых (Г.Г. Гамбаров и Б. Блох, Г.А. Зедгенидзе, А.Р. Jonkhoff), применяя это же воздействие, получили рак кожи у кроликов и саркому у мышей.

G.M. Findlay, A.H. Roffo, H.H. Петров доказали, что злокачественные опухоли могут возникать под воздействием ультрафиолетового излучения. Кроме того, введение радиоактивных веществ крысам и кроликам, обезьянам и морским свинкам приводило к появлению злокачественных новообразований (F. Deals и др., 1926).

Хотелось бы отметить, что экспериментальная онкология имеет большой запас весомых открытий в области возникновения профессионального рака. Первыми идут химические агенты различной природы, в результате воздействия которых происходит перерождение клеток. Значимое обоснование концепции химического онкогенеза в эксперименте было найдено японскими исследователями К. Yamagiwa, К. Ichikawa (1914-1916). Путем втирания каменноугольной смолы они добились возникновения плоскоклеточного ороговевающего рака кожи у кроликов. Кроме того, в тридцатых годах 20 века в мире была получена

серия химически чистых онкогенных веществ и доказано их избирательное воздействие на различные органы и ткани.

Начало 20 века было отмечено научными достижениями Н.А. Вельяминова, который впервые предположил, что при раке молочной железы имеет значение нарушение функций желез внутренней секреции. Экспериментально эта теория была доказана в 1932 году ученым А. Лакассань при моделировании рака молочной железы у мышей-самцов (при введении фолликулина). Кроме того, независимо друг от друга многими другими исследователями было выявлено, что при введении половых гормонов наблюдается развитие опухолей гипофиза, молочной железы, матки, предстательной железы, сопровождающееся нарушениями функций гипофиза и обмена веществ, особенно обмена стероидов.

Немногим позже история онкологии дополнилась наградами и общественным признанием деятельности выдающихся ученых-онкологов, хирургов, труды которых отмечены различными премиями. Одной из самых весомых является Нобелевская. Так, Нобелевским лауреатом стал А. Каррель (Франция, 1912) за создание метода культивирования тканей; Й. Фибигер (Дания, 1926) - за «открытие паразита, вызывающего рак»; Г. Меллер (США, 1946 г.) – за метод получения мутации с помощью рентгена; Ф. Раус (США, 1966) – за открытие первого вируса саркомы. В 1976 году за дальнейшее изучение вирусов саркомы была награждена группа ученых (под руководством Р. Дульбекко) из США. Г. Келер (Германия), С. Мильштейн (Англия) и Н. Ерне (Дания) в 1984 году удостоены премии за разработку метода получения моноклональных антител, а в 1989 году Дж. Бишоп и Г. Вармус (США) – за открытие первого онкогена вируса саркомы Рауса. В 2001 году У. Ноулз с соавторами получил премию за разработку технологии синтеза противораковых препаратов на основе хиральных молекул. Открытие ключевых генов, регулирующих развитие органов и запрограммированную смерть клетки (апоптоз) отмечено Нобелевской премией (С. Бреннер и соавт.) в 2002 году. В области медицины и физиологии лауреатами Нобелевской премии стали генетики Э. Файр и К. Мело за исследования свойств РНК, которые могут использоваться в лечении рака и других заболеваний (2006). Благодаря открытиям в области эмбриональных стволовых клеток у млекопитающих как надежного научного инструмента для биомедицинских исследований в

области онкологии и терапии других заболеваний М. Капекки (США), М. Эванс (Великобритания) и О. Смитис (США) стали лауреатами данной премии в 2007 году. За выявление вирусов папилломы человека (ВПЧ), вызывающих рак шейки матки, премия была присуждена Х. Цурхаузен (Германия). Э. Блэкберн, К. Грейдер и Дж. Шостак получили эту же премию в 2009 году за открытие механизма защиты хромосом теломерой и фермента теломеразы. Теломеры играют определенную роль в возрастных изменениях клеток и всего организма и в развитии злокачественных заболеваний. Дальнейшие исследования их динамики и принципов работы удлиняющего их фермента теломеразы могут помочь найти новые пути борьбы со старением и раком.

В 2011 году Ж. Хоффман, Б. Бойтлер получили Нобелевскую премию по медицине за работы по изучению активации врожденного иммунитета, а Р. Стейнмен – за открытие дендритных клеток и изучение их значения для приобретённого иммунитета; С. Яманака и Дж. Гёрдон (2012) – за работы в области биологии развития и получения индуцированных стволовых клеток. В период с 2013 по 2018 годы Нобелевская премия по медицине была присуждена: Дж. Ротману, Р. Шекману и Т. Зюдхофу – за открытие механизма, регулирующего везикулярный трафик; Дж. Холлу, М. Янгу – за исследования молекулярных механизмов контроля циркадных ритмов.

Хотелось бы сказать, что отечественная экспериментальная и практическая онкология, благодаря упорному труду ученых и медиков, также достигла немалых высот. Ведется работа по установлению фазного механизма движения и контроля формы опухолевых клеток, трансформированных разными онкогенами, лежащих в основе опухолевой инвазии; разрабатываются новые маркеры для дифференциальной диагностики опухолей молочной железы и шейки матки; биологические микрочипы на основе иммуноглобулинов для диагностики лимфом и лейкозов; изучаются системы развития множественной лекарственной устойчивости на молекулярном и клеточном уровнях, а также индивидуальные подходы к метаболизму канцерогенных веществ, определяющих риск бластомогенеза; проводятся молекулярно-генетические исследования, касающиеся патогенетических механизмов возникновения и биологии опухолей для применения полученных результатов для таргетной терапии.

Таким образом, накоплен значительный ба-

гаж знаний в области экспериментальной и клинической онкологии. Несмотря на это, проблема раковых заболеваний остается весьма актуальной. Выяснение новых механизмов возникновения злокачественных опухолей будет способствовать их ранней диагностике и нивелированию последствий для организма.

### Экспериментальные модели

Для изучения молекулярно-генетических механизмов бластомогенеза крайне важно подобрать соответствующую модель. Адекватность использования моделирования рака *in vivo* зависит от точности воспроизведения онкозаболевания, включающего равные гистопатологические особенности перевиваемых образцов, стадийность, физиологические и системные эффекты. Кроме того, в экспрессии и развитии опухоли должны участвовать одинаковые гены и биохимические пути, а ответ организма как системы должен быть максимально достоверным при применении специфического лечения для точного прогноза терапевтической эффективности [4, 5].

Для исследования онкогенеза на сегодняшний день наиболее часто используют мышинные и крысиные модели, хотя иногда упоминаются и другие [6-8].

По нашему мнению, мышь как модель имеет ряд преимуществ по сравнению с другими млекопитающими: финансово выгодное содержание, короткий репродуктивный цикл, возможность использования методов генной инженерии.

В 1909 году первая инбредная линия мышей (DBA) была получена американским онкологом Литтлом. Дальнейшая работа по созданию линий мышей для онкологических исследований позволила вывести несколько сот линий, каждая из которых имеет определенные характеристики. У одних в определенном возрасте могут возникать опухоли печени, молочной железы, легких или лейкозы. Их называют высокораковые и высоколейкозные линии. Высокоракowymi линиями мышей являются A/Sn, C3H/Sn, DBA/1, CBA/1 (рак молочных желез); CBA/Lac, C3HA (опухоли печени); AKR/1, C58, DBA/2 (лейкозы); линия 101/H используется для индукции кожных и легочных опухолей.

У низкораковых животных опухоли возникают с малой частотой или не возникают совсем. К таким представителям можно отнести знаменитую линию BALB/c (Bagg albino C), созданную Хелси Баггом, C57Bl/6J – инбредную линию черной ма-

сти, которая используется практически во всех медицинских и биологических исследованиях. Обе вышеперечисленные линии являются стандартными для поддержания мутаций, исследования культур тканей, гематологии, химиотерапии рака.

Для работ иммунологов и онкологов требуются мыши с подавленным иммунитетом (ксенографты). У этих мышей отсутствует тимус (вилочковая железа) и волосяной покров. Они известны под названием «голые мыши» (nude mouse). У ксенографтов блокируются (нокаутуются) отдельные гены ради исследования их функций или симулирования человеческих заболеваний. У трансгенных мышей геном также может содержать вживленные чужеродные гены. Одной из разновидностей таких животных являются онкомыши – (genetically engineered mouse models – GEMM). GEMM позволяют достаточно точно моделировать спорадические человеческие опухоли за счет контролируемого изменения генома, что обеспечивает развитие конкретной опухоли с определенными свойствами в заданной локализации.

Ярким примером трансгенных мышей является линия с повышенной экспрессией онкогена HER2/neu. У этих животных в возрасте от 2 месяцев появляются опухоли молочных желез (HER2/neu-положительных).

Кроме мышей, к настоящему времени созданы и инбредные линии крыс, большинство которых получены в виварии при Вистаровском институте США (линия Wistar). Хотя крысы Wistar не являются высококачественной линией, они применяются в экспериментах связанных с индукцией опухолей канцерогенами, а также для работы с перевиваемыми опухолями [2, 3].

### **Клеточные линии для воспроизведения канцерогенеза**

В качестве экспериментальных моделей в онкологии широко используют перевиваемые или постоянные клеточные линии, которые представляют собой клетки различных опухолевых и неопухолевых тканей человека и животных, способные к росту и размножению в условиях *in vitro* и *in vivo* [9].

Принято различать следующие типы культур клеток: первичные и перевиваемые. Первичные культуры получают из клеток, выделенных из органов или тканей при помощи ферментативной обработки или методом эксплантов. Как описано в литературе, лучше всего проводить забор ма-

териала из органов эмбрионов, так как для таких клеточных структур характерен высокий потенциал к росту (почки, легкие, кожу, тимус, тестикулы эмбрионов). В лабораторных условиях культуры растут либо в суспензии (в виде отдельных или небольших свободноплавающих микроколоний клеток) или в виде монослоя [9].

Известно, что в экспериментальной практике используют субкультуры, которые получают из первичных клеток, выращенных в культуральных флаконах. Полученные клетки снимают с поверхности раствором версена или трипсина, ресуспендируют в новой питательной среде и пересевают заново. Примерно через 3–4 суток возможно формирование монослоя. Важным является тот аспект, что, если клеточные культуры прошли более 10 пассажей, они уже на стадии перехода к перевиваемым культурам клеток.

Перевиваемые культуры клеток – это клетки, способные неопределенно длительное время размножаться вне организма. В лабораториях их поддерживают путем пересевов с заменой питательной среды. Чаще всего такие клетки имеют одинаковую форму, гетероплоидны, по сравнению с первичными, достаточно стабильны в условиях роста *in vitro*. Показано, что перевиваемые культуры можно получать как из здоровых тканей, так и из опухолевых.

Процесс получения клеточных линий чрезвычайно сложен и длителен. Обычно выход культивированных *in vitro* клеток в постоянные клеточные линии не превышает 1–2%.

В питательную среду, находящуюся в культуральной посуде, высевают опухолевые или нормальные клетки с добавлением (при необходимости) факторов роста и помещают в термостат. В термостате при оптимальных условиях происходит адаптация и размножение клеток с образованием культуры клеток (суспензионной или монослойной). В дальнейшем осуществляется промывка монослоя клеток с удалением нежизнеспособных клеток со следующим пересевом небольшого числа жизнеспособных клеток в новые емкости. Результатом многократных пассажей является получение клеток, адаптированных к росту в культуральной среде, обладающих уникальными свойствами. Для длительного сохранения полученные культуры подвергают криоконсервации в специальных жидких средах.

На данный момент в Европейской коллекции клеточных культур (ECACC) находится огромное количество наименований. Республика

Беларусь также обладает своим банком клеток. К примеру, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии г. Минска (лаборатория иммунологии и клеточной биотехнологии) для воспроизведения экспериментальных моделей располагает следующими линиями клеток: 46-47 – африканская зеленая мартышка; глиобластома человека – A-172; С6 – глиома крысы; C8166 – Т-лимфобластный лейкоз человека; CaCo-2 – человек, аденокарцинома ободочной кишки; CCRF-SB – человек, острый лимфобластный лейкоз (В-клетки); CEM.NKR – человек, Т-лимфобластный лейкоз; Daudi – человек, лимфома Беркитта; EL-4 – мышь, лимфома, индуцированная диметилбензантраценом; FL – человек, амнион; FRhK-4 – макака-резус, почка; HaCaT – человек, иммортализованные кератиноциты; HEK-293 – человек, почка эмбриона; Hela М – человек, эпителиоподобная карцинома шейки матки; HEP-2 – человек, эпидермоидная карцинома гортани; HL-60 – человек, промиелоцитарный лейкоз; HuTu 80 – человек, аденокарцинома двенадцатиперстной кишки; IM-9 – человек, миелома; IMR-32 – человек, нейробластома; Jurkat – человек, Т-лимфобластный лейкоз; Jurkat-tat – человек, Т-лимфобластный лейкоз; KG-1 – человек, острый миелоидный лейкоз; L929 – мышь, эмбрион; L1210 – мышь, асцитная жидкость (лимфобластный лейкоз); Ma-104 – макака-резус, почка эмбриона; McCoy В – мышь, клетки синовиальной жидкости; MDCK – собака, почка; MDCK (NBL) – собака, почка; Molt-3 – человек, Т-лимфобластный лейкоз; Molt-4 – человек, Т-лимфобластный лейкоз; Molt-4, Клон 8 – человек, Т-лимфобластный лейкоз; MRC-5 – человек, легкое эмбриона; MT-2 – человек, Т-лимфобластный лейкоз; MT-4 – человек, Т-лимфобластный лейкоз; NFS-60 – мышь, миелоидный лейкоз; OKF-GS – человек, карцинома почки; P388D1 – мышь DBA/2, лимфоидная неоплазма; P3X63Ag8.653 – мышь BALB/с, миелома, клон линии P3X63Ag8; PA-1 – человек, тератокарцинома яичника; Raji – человек, лимфома Беркитта; RD – человек, эмбриональная рабдомиосаркома; RPMI-1788 – человек, лейкоциты периферической крови здорового донора; T24 – человек, карцинома мочевого пузыря; U-2 OS – человек, остеосаркома; U-251 – человек, глиома; U-937 – человек, гистиоцитарная лимфома; Vero – африканская зеленая мартышка, почка; Vero (V) – африканская зеленая мартышка, почка, сублиния Vero; ZR-75-1 – человек, рак молочной железы; СПЭВ – свинья, почка эмбриона; CV-1 – африканская зеленая мартышка, почка; HCT-116 – чело-

век, карцинома толстой кишки; THP-1 – человек, острый моноцитарный лейкоз; MDBK (NBL-1) – бык домашний, почка.

### Методы воспроизведения асцитной и солидной опухолей на экспериментальных животных

При экспериментальном воспроизведении опухолевого процесса можно добиться возникновения асцитной и солидной форм злокачественных образований [10, 11]. Асцитные – перевиваемые внутрибрюшинно, вызывающие образование в полости брюшины экссудата, содержащего опухолевые клетки, и солидные – опухоли, развившиеся не из клеток кроветворной системы (негемопэтические). Салидные опухоли могут быть доброкачественными и злокачественными, но чаще говоря о них, подразумевают именно злокачественные опухоли [11, 12].

На данный момент многообразие моделей экспериментальной онкологии предлагает к воспроизведению спонтанные и индуцированные перевиваемые опухоли с помощью гомотрансплантации (аутоотрансплантация, сингенная) и гетеротрансплантации (алло- и ксенотрансплантация) различными способами [13, 14].

Спонтанные опухоли животных применяются довольно часто для постановки экспериментов. Спонтанными они называются потому, что возникают у представителей животного мира без каких-либо воздействий со стороны экспериментатора. Изучение такого типа новообразований способствует выявлению основных закономерностей злокачественного роста, которые схожи для всех живых организмов. Впервые такой тип возникновения канцерогенных процессов был зафиксирован и применен в опытах с использованием нелинейных животных [15].

Известно, что наиболее популярным объектом у онкологов среди беспозвоночных животных является дрозофила. На этом виде плодовой мухи часто проводятся изучения механизмов генетической предрасположенности к опухолям. Кроме мух, в экспериментах используют рыб как наиболее удобную модель для исследования канцерогенных факторов в естественных условиях. Но классическими объектами экспериментальной онкологии, несомненно, являются млекопитающие. Предпочтение, прежде всего, отдается мышам и крысам, которые хорошо адаптируются к условиям жизни в неволе и дают многочисленное

потомство. Дело в том, что у мышей чаще всего встречаются опухоли молочных желез, которые могут возникнуть множественно (у самок пять пар молочных желез) [16, 17].

Что касается неллинейных крыс, то спонтанные опухоли молочных желез возникают гораздо реже, чем у мышей, но они также служат объектом исследования онкологов.

Показано, что у кроликов часто возникает папиллома, вызываемая ДНК-содержащим вирусом, которая изначально представляет собой доброкачественные новообразования на коже ушей, со временем превращающиеся в злокачественную опухоль, дающую метастазы в легкие и лимфоузлы. Такая модель может применяться для изучения вирусного этиогенеза и иммунологических аспектов рака [2, 18].

Что касается домашних животных, то в большей степени бластомагенез зафиксирован у собак. Как модель в нашей стране этих животных практически не используют из-за этических соображений (исключение в некоторых странах – на последних предклинических этапах испытания противоопухолевых химических соединений).

Несмотря на все вышеперечисленное, минусом использования спонтанных опухолей как онкомодели является низкая частота их возникновения и, как результат, трудности с одномоментным использованием материала в объеме, достаточном для изучения.

Впервые экспериментальным путем индуцированные опухоли получили Ямагива и Ишикава с помощью многократного смазывания кожи кролика каменноугольным дегтем. В скором времени канцерогенные вещества были выделены в чистом виде и стали использоваться для индукции опухолей у животных [18, 19].

Известно, что возникновение опухолевых структур может быть индуцировано у животных и человека онкогенными вирусами. Так, например, лимфома Беркитта, распространенная в Африке, может иметь вирусную этиологию. Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) на фоне общей иммунодепрессии может вызывать развитие саркомы Капоши и лимфомы. Имеются данные, что вирус папилломы (особенно тип 16 и 18) увеличивает вероятность заболевания раком шейки матки. В группу повышенного риска входят лица, больные гепатитами В и С. Изменения в печени, вызываемые этими вирусами, создают условия для возникновения рака печени.

Известно, что новообразования различной

этиологии могут возникнуть под воздействием различных видов облучения. Так, у людей и экспериментальных животных, подвергшихся действию ионизирующей радиации, чаще всего возникают опухоли кроветворной ткани, костей, легких, печени, щитовидной железы и других органов.

Одну из главных ролей в патогенезе злокачественных опухолей может играть нарушение баланса гормонов. В эксперименте по моделированию бластомагенеза при введении гормонов или, наоборот, удаления желез внутренней секреции (гипофиза, яичников) многими учеными показан интенсивный рост и развитие опухолей у животных.

Из всего вышеизложенного понятно, что модели опухолей животных, индуцированные абиотическими и биотическими факторами, а также модели злокачественно трансформированных клеток, культивируемых в условиях *in vitro*, позволят более предметно рассмотреть общую концепцию молекулярных механизмов возникновения опухолей и, в принципе, имеют свою актуальность по сей день. Но их многообразие, сложности в воспроизведении требуют разработки новых подходов с учетом всех достижений ученых и медиков как прошлого, так и современного этапа развития науки.

### **Методы перевивки спонтанной и индуцируемой опухолей на животной модели (гомо- и гетеротрансплантация)**

Из наиболее известных методов воспроизведения экспериментального опухолевого процесса можно выделить перевивку в переднюю камеру глаза. В начале работы животное в первую очередь подвергают наркозу. Далее отодвигают веки, глазным скальпелем по верхнему краю лимба делают небольшой надрез роговицы и пинцетом в надрез помещают образец опухолевой ткани диаметром 1-2 мм. После этого веко животного обрабатывают и проводят ежедневный контроль его состояния. Чаще всего заметные изменения фиксируют примерно на 4 неделе после проведенной манипуляции, но при перевивке гетерологических опухолей, особенно опухолей человека, результат можно увидеть только через несколько месяцев [1-4].

К преимуществу метода трансплантации в переднюю камеру глаза можно отнести возможность прижизненного наблюдения за всеми процессами после перевивки, а к минусам то, что даже при сверхинтенсивном росте трансплантата, он достигает очень малых объемов и использование его для серий перевивок практически невозможно.

Следующий метод – перевивка в мозг. У крупных животных (кроликов, морских свинок, крыс) после наркотизации, удаления шерсти в области операционного поля и обработки операционного поля антисептическим раствором скальпелем делают надрез кожи в теменной области (кпереди от уха, с отступом на 5 мм от средней линии). Далее края кожи разводят и делают бормашиной трепанационное отверстие в черепе. После этого через отверстие в ткань мозга вводят кусочек опухоли с помощью троакара или иглы Дюфо с несколько затупленным концом. Заканчивают процедуру накладыванием 2 швов [1-4].

Методика перевивки опухоли в мозг мелким животным (мышам) более проста. Сначала готовят троакар (или иглу для пневмоторакса) в который заранее закладывают трансплантат. Далее грызуна «оглушают» эфиром, указательным и большим пальцами левой руки фиксируют голову мыши, кожу головы смазывают йодной настойкой. Троакаром прокалывают кожу и кость черепа (несколько кпереди и выше уха, не доходя до средней линии), и вживляемый кусочек выталкивают мандреном в ткань мозга, после чего иглу быстро извлекают. Отдельные особи могут погибнуть через 1-3 дня после манипуляции, а у остальных видимые изменения начинают наблюдаться в сроки от одной недели до 5 месяцев (индивидуально). Так, на поздних стадиях могут появляться симптомы нарушения ЦНС (центральной нервной системы): вялость, парезы, вестибулярные нарушения (постоянное «кружение»). К визуальным признакам также относят характерное выпячивание теменных костей. Как отмечают исследователи, после появления этих симптомов животные погибают. При вскрытии у них визуализируется опухолевый узел, расположенный на поверхности или в толще полушария мозга [11, 20].

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что данный метод характеризуется несколькими недостатками: сложность манипуляций и невозможность слежения за трансплантатом до самого момента смерти животного, а это является очень важным. Дело в том, что если рост трансплантата незначителен, то клинические симптомы могут не возникнуть вообще и опухолевую ткань удастся обнаружить только при гистологическом исследовании мозга.

В 1954 году описан способ перевивки опухоли в ткань легкого мыши путем введения взвеси опухолевой ткани в нос («Воспроизведение заболеваний у животных для экспериментально-тера-

певтических исследований», Лазарев Н.В., 1954). Ступени перевивки следующие: мыши подвергаются легкому эфирному наркозу. Далее пастеровской пипеткой или туберкулиновым шприцем на кончик носа мышью наносят асцитическую жидкость, полученную при карциноме Эрлиха мышью, закрывая обе ноздри (около 10 капель=0,05 мл по мере втягивания их мышью в нос). Правильно проведенные манипуляции дают более 90% удачных перевивок. Узелки опухоли обнаруживаются на 12-15 день, а опухоли значительной величины – на 20-25 день.

Один из способов воспроизведения злокачественного процесса в эксперименте предложен Ю.С. Сидоренко и соавт. в 1991 году на примере перевивки саркомы С-45 (крысиная) самцам белых беспородных крыс. Авторы предлагают этот способ для получения злокачественной опухоли, растущей в ткани легкого. Взвесь опухолевых клеток перед введением разводят стерильным физиологическим раствором 1:5 по объему и набирают в стерильный шприц. Самцам белых беспородных крыс, после фиксации их на спине, вводят опухолевую взвесь в подключичную вену в дозе 0,5 мл. На 14-21 сутки от момента перевивки саркомы С-45 у самцов развивается визуализируемая опухоль, которую можно извлечь и перевить. По мнению авторов, этот способ должен обеспечивать 100% воспроизводимость, приводя к перевивке опухолевых трансплантатов во всех случаях, что, в свою очередь, даст возможность постановки массовых экспериментов за относительно короткий срок и в большом количестве при простоте исполнения [21].

Коллективом ученых Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» (Истомин Ю.П. и др.) в 2012 году был предложен способ соно-фотодинамической терапии перевитой подкожно клеток глиомы линии С6 у крысы. Эта глиома относится по видовой принадлежности к крысиным опухолям. Способ перевивки осуществляли следующим образом. Опухоль имплантировали подкожно, в левую паховую область путем введения 0,5 мл 10%-ной опухолевой взвеси в растворе Хенкса. Через 10-12 дней по достижении размеров опухоли 1,0-1,5 см в диаметре животное можно использовать для дальнейшего эксперимента [22].

Показано, что среди перевиваемых меланом наиболее часто применяют меланомы мышью – Хардинга-Пасси, В-16 и S-91 Клаудмана. Из-



вестно, что меланома B16 возникла спонтанно у основания уха в коже мыши линии C57BL/6 в 1954 году. Полученный штамм до сих пор поддерживается на мышцах линии C57BL/6 путем перевивки опухолевой взвеси. Кроме того, отмечено, что поведение трансплантата меланомы зависит от способа перевивки. К примеру, при перевивке под кожу развитие опухоли составляет 100% и меланома метастазирует преимущественно гематогенно в легкие (60-90%), реже – в печень и селезенку [20, 23, 24]. Для инъекции опухолевых клеток в хвостовую вену с 90% частотой характерно развитие метастазов в легких. Внутривентриальная имплантация этих онкоклеток приводит к росту в виде множественных мелких узелков, выстилающих брюшную полость. Полученная таким образом популяция клеток опухоли гетерогенна и состоит как из сильно пигментированных участков, так и фрагментов с незначительным содержанием или полным отсутствием меланина. Модальный класс опухоли насчитывает 40 хромосом. Проллиферативный пул в момент перевивки опухоли составляет 71,6% [23, 25].

В 2010 году Сеньковой А.В. в процессе диссертационного исследования была применена методика перевивки мышью с лимфосаркомы RLS40. Суспензию клеток опухоли RLS40 в физиологическом растворе ( $5 \times 10^6$  кл/мл) объемом 0,1 мл трансплантировали мышам внутримышечно в правую заднюю лапку для формирования солидной опухоли. Как пишет автор, на 17-ый день опухолевого роста опухоль достигла значительных размеров, что позволило проводить дальнейшие манипуляции [26, 27].

Другим ученым (Киреева Г.С., 2015 г.) при проведении внутривентриального химиоперфузионного лечения диссеминированного рака яичника в эксперименте был использован штамм опухоли яичника (ОЯ), который вводился крысам внутривентриально. Асцитическую жидкость получали путем пассажа от крысы крысе. Кожу живота животного с ОЯ обрабатывали 5% спиртовым раствором йода, иглой среднего диаметра осторожно прокалывали брюшную стенку и набирали в шприц асцитическую жидкость. Затем готовили разведение асцита в соотношении 1:4 – к 1 мл асцита добавляли 3 мл 0,9% физиологического раствора. Подсчет опухолевых клеток проводили в камере Горяева. Далее кожу живота крысы-реципиента обрабатывали 5% спиртовым раствором йода, иглой среднего диаметра осторожно прокалывали брюшную стенку, после чего вводили

внутрибрюшинно онкоклетки в количестве  $1 \times 10^7$ . Приживление ОЯ составляла 100%. Опухоль быстро прогрессировала, приводя к развитию перитонеального карциноматоза, асцита и гибели крыс на 9-17-й дни после перевивки. На вскрытии регистрировали опухолевый асцит (от умеренного до выраженного), который в 90% случаев был геморагический. У крыс, проживших 15-17 дней, отмечали опухолевые узлы белого цвета размерами 1-3 мм в большом сальнике, брыжейке кишечника, на париетальной и висцеральной брюшине [28, 29].

Гетеротрансплантация опухолевых структур животным, получающим кортизон (препарат, способствующий подавлению иммунных и аллергических реакций), применяется достаточно широко в научной практике. В опыт чаще всего берут мышевидных грызунов, не достигших половой зрелости. Клеточную суспензию перевиваемой опухоли вводят под кожу спины или внутривентриально шприцем, после чего сразу же, немного отступив от места первой инъекции, вводят кортизон из расчета 0,05 мг на грамм массы тела животного. Манипуляции с введением кортизона подопытным повторяют с регулярностью два раза в неделю до конца опыта в тех же дозах. Как отмечают исследователи, кортизон может оказать выраженное токсическое действие на животных, поэтому необходимо постоянное наблюдение. При появлении признаков интоксикации инъекции прекращают или уменьшают дозировку. В некоторых научных работах сказано, что если за 3 суток перед перевивкой произвести облучение мышевидных грызунов рентгеновыми лучами (в дозе до 200 r), то дозировку кортизона можно сократить в два раза [30].

Так, в ряде экспериментов по перевивке крысам некоторых опухолей мышей на 10-12 день после трансплантации у реципиентов, получавших кортизон, образовывались опухолевые узлы внушительных размеров.

Однако если грызунам приживляли злокачественные опухоли человека (+ кортизон по схеме), то значительного роста структур не происходило. У животных после вскрытия (12-14-е сутки) в области введения раковых клеток фиксировались только небольшие узелки, при гистологическом исследовании которых констатировалось наличие опухолевой ткани.

Существует еще один метод перевивки гетерологических опухолей – в защечные мешки хомякам (*Mesocricetus auratus*, массой 60-80 грамм). Под наркозом у животного пальцем выворачивают защечный мешок, слизистую которого глаз-

ным пинцетом вытягивают наружу, расправляют и промакивают марлей. Далее с помощью шприца с иглой, содержащего предварительно подготовленную суспензию опухолевых клеток, делают прокол слизистой у основания защечного мешка, медленно проводя иглу к его верхней части, после чего вводят 0,1-0,2 мл суспензии. Если нужно ввести не суспензию, а кусочки тканей, можно воспользоваться троакаром. Многие ученые рекомендуют перевивку в оба мешка. Далее, независимо от выбранного объекта трансплантации, незамедлительно под кожу хомяку вводят кортизон по той же схеме и с таким же контролем, как и у вышеописанных животных.

Хотелось бы отметить, что после такой трансплантации некоторые штаммы мышинных опухолей показывают значительный рост в защечном мешке хомяка через 10-15 дней после манипуляций. Трансплантат растет непосредственно под прозрачной слизистой оболочкой, что позволяет отслеживать все изменения. Однако вживляемые новообразования человека независимо от того, вводилась ли клеточная суспензия или кусочек ткани, показывают рост через 2-3 месяца после введения. Это, конечно, относится к существенным минусам.

Следующий запатентованный способ моделирования лимфогенного и гематогенного метастазирования мышинной меланомы B16 у белых нелинейных крыс (О.И. Кит и соавт., 2016) заключается в том, что после предварительного выведения селезенки под кожу передней брюшной стенки через 2 недели в нее имплантируют суспензию опухолевых клеток мышинной меланомы B16 в физиологическом растворе объемом 0,1 мл (разведение 1:10). Через полгода от момента перевивки регистрируют лимфогенный и гематогенный путь распространения меланомы с морфологически подтвержденным метастатическим поражением внутренних органов [31].

В.И. Киселевым и соавт. в процессе изучения эффективности новой фармацевтической композиции дииндолилметана в отношении подавления ксенографтов опухолей эндометрия был использован метод пересадки клеточной культуры рака эндометрия (РЭ) человека линий РЭ CRL-1622 (KLE) и НТВ-113 (HEC-1-B). HEC-1-B представляет собой клетки высокодифференцированной аденокарциномы, а KLE – низкодифференцированной. Мышам Balb/c-nude (nu/nu) массой 19-25 грамм в возрасте 5-6 месяцев, в зависимости от группы, проводили подкожное

введение (вдоль позвоночника, в районе левой лопатки) культуры клеток в дозе 5 миллионов ( $25 \times 10^6$  клеток/мл на животное).

В модели РЭ человека CRL-1622 (KLE) средняя продолжительность жизни мышей составила  $32,9 \pm 6,55$  дня. Средний объем развившихся опухолей составил  $1\,635,05\text{ мм}^3$  [32].

Продолжительность жизни мышей группы KLE составила  $35,4 \pm 5,14$  дня, а средний объем развившихся ксенографтных опухолей составил  $1\,616,7\text{ мм}^3$ .

При изучении спектра биологических активностей новых производных глицирретовой кислоты и молекулярных механизмов их действия А.В. Марковым были использованы опухолевые клеточные линии человека: эпидермоидной карциномы KB-3-1, эпидермоидной карциномы шейки матки HeLa, нейробластомы SK-N-MC, аденокарциномы молочной железы MCF-7, гепатоцеллюлярной карциномы HepG2, аденокарциномы прямой кишки HuTu-80, аденокарциномы легких A549. Мышам линии A/Sn в возрасте 2-3 месяцев соответственно группам внутривенно вводили клеточную суспензию в объеме 0,5 мл, содержащую  $5 \times 10^4$  клеток. Образование опухоли фиксировали на 14 день соответственно [32].

В свою очередь, Е.А. Соколовой в 2016 году при проведении исследования на тему «Флуоресцирующая модель HER2-гиперэкспрессирующей опухоли яичника человека и ее использование для оценки эффективности таргетного иммунотоксина на основе экзотоксина А» для получения флуоресцирующей ксенографтной опухолевой модели использовались иммунодефицитные мыши линии BALB/c-Nude (самки, 17-23 г, 4-6 недель). Мышам вводили суспензию клеток SKOV-3 в PBS (аденокарцинома яичника человека,  $2 \times 10^6$  клеток/животное) подкожно в область лопатки. На месте инъекции в течение 24 суток формировались опухолевые узлы с типичной морфологической структурой: опухолевые клетки имели крупные размеры и светлую вакуолизированную цитоплазму, очагов некроза автором обнаружено не было [33].

Таким образом, на данный момент существует большое количество методов, способов и предложений по воспроизведению той или иной модели, касающейся гомо- и гетеротрансплантации опухолей. Но все они достаточно разные: по дозировке опухолевых клеток для перевивки и срокам проведения опыта, линиям животных. Кроме того, в 98% случаев в эксперименте ис-

пользуют опухоли животных, возникшие спонтанно или развившиеся после перевивки от животного к животному.

Основываясь на данных литературы, можно сделать вывод, что трудности в экспериментах могут возникнуть из-за неправильного проведения оценки характера и состояния перевиваемой опухолевой ткани или онкоклеток; наличия в трансплантате большого количества фиброзной стромы; несоблюдения тканевой и внешней стерильности; нарушения качества приживляемых объектов; большого временного интервала между изъятием опухоли или снятием культуры с подложки и перевивкой (жизнеспособность клеток). Показано, что больший успех трансплантации наблюдается при перевивке изучаемого объекта от животного к животному одной видовой принадлежности. Однако ученые применяют и разрабатывают новые подходы к воспроизведению гетеротрансплантационных моделей. Все чаще используют опухолевые культуры клеток человека как *in vivo*, так и *in vitro*. С помощью высокоразвитых технологий исследователи создают молекулярно-генетические модели для изучения свойства опухолевых структур, закономерностей их роста и механизмов их метастазирования. Однако независимо от выбранных методик и подходов процесс воспроизведения онкологической модели трудоемок и длителен, а результат может получиться противоречивым. Показано, что при ксенотрансплантации опухолевых структур человека лучше всего прививаются плоскоклеточные раки и некоторые саркомы, а наибольшие проблемы возникают при моделировании бластоогенеза желудка, лимфосаркомы и других опухолей лимфоидной ткани.

## Заключение

Разработка новых методов, способов воспроизведения современных гетеротрансплантационных опухолевых моделей является необходимой. Это позволит изучить аспекты взаимоотношений опухоли и хозяина, прояснить вопрос об изменчивости опухолевой ткани, ее биохимические особенности. Полученные результаты могут внести неоспоримый вклад в оценку химиотерапевтических противоопухолевых препаратов, разработку принципов векторного воздействия с помощью вирусов, избирательно разрушающих опухолевую ткань. Все вышеперечисленное показывает ценность и необходимость разработки

новых моделей для решения различных проблем патогенеза и терапии злокачественных опухолей.

## Литература

1. Модели и методы экспериментальной онкологии : практ. пособие / ред. А. Д. Тимофеевский. – М. : Медгиз, 1960. – 246 с.
2. Попова, Н. А. Модели экспериментальной онкологии / Н. А. Попова // Соросов. общ.образоват. журн. – 2000. – Т. 6, № 8. – С. 33–38.
3. Новости онкологии. Alloncology.com : [сайт]. – М., 2009–2011. – Режим доступа: <http://alloncology.com/articles/7/5/>. – Дата доступа: 30.06.2018.
4. Марков, А. В. Спектр биологических активностей новых производных глицирретовой кислоты и молекулярные механизмы их действия : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.04 / А. В. Марков. – Новосибирск, 2015. – 22 с.
5. Структурные изменения в тимусе лабораторных крыс при развитии перевивных и спонтанных опухолей / Е. С. Джадранов [и др.] // Вестн. КазНМУ. – 2016. – № 4. – С. 287–292.
6. Печень крыс при продвинутых стадиях развития карциносаркомы Walker 256 / Т. А. Кунц [и др.] // Вестн. НГУ. Сер. Биология, клин. медицина. – 2011. – Т. 9, вып. 2. – С. 126–129.
7. Морфологические особенности печени мышей с метастатическим опухолевым процессом / О. В. Лебединская [и др.] // Современ. наука. технологии. – 2006. – № 5. – С. 32–33.
8. Структурные изменения в экспериментальной перевивной опухоли крыс лимфосаркома плисса после лечения циклофосфаном / Е. С. Джадранов [и др.] // Вестн. КазНМУ. – 2015. – № 3. – С. 213–215.
9. Культивирование вирусов в культурах клеток : учеб.-метод. пособие / Р. Б. Корочкин [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2010. – 43 с.
10. Tillmann, T. Incidence and spectrum of spontaneous neoplasms in male and female CBA/J mice / T. Tillmann, K. Kamino, U. Mohr // Exp. Toxicol. Pathol. – 2000 Jun. – Vol. 52, N 3. – P. 221–225.
11. Экспериментальная модель опухоли головы и шеи для потенциальной таргетной терапии / И. В. Решетов [и др.] // Сиб. онкол. журн. – 2009. – № 5. – С. 43–48.
12. Гольдберг, В. Е. Современные достижения лекарственной терапии злокачественных новообразований / В. Е. Гольдберг, М. Г. Матяш // Бюл. СО РАМН. – 2004. – № 2. – С. 36–40.
13. Каледин, В. И. Изучение эффективности моно- и химиотерапии на модели перевиваемой мышинной лимфосаркомы, нечувствительной к индукции апоптоза / В. И. Каледин, Н. А. Попова, Е. М. Андреева // Вопр. онкологии. – 2006. – Т. 52, № 1. – С. 70–73.
14. Циклофосфамид - индуцированный апоптоз клеток мышинной лимфосаркомы в условиях *in vivo* / В. И. Каледин [и др.] // Вопр. онкологии. – 2000. – Т. 46, № 5. – С. 588–593.
15. Animal model of drug-resistant tumor progression / N. Mironova [et al.] // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2006 Dec. – Vol. 1091. – P. 490–500.
16. Участие генов *mdr1a*, *mdr1b*, *p53* и *bcl-2* в формировании

- устойчивости клеток лимфосаркомы RLS мышей к терапевтическому действию циклофосфана / Е. М. Андреева [и др.] // Вестн. НГУ. Сер. Биология, клин. медицина. – 2006. – Т. 4, вып. 1. – С. 21–26.
17. Введение в химиотерапию злокачественных опухолей / М. Л. Гершанович [и др.]. – СПб. : Социс, 1999. – 143 с.
  18. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good prognosis diffuse large-B-cell lymphoma : a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group / M. Pfreundschuh [et al.] // Lancet Oncol. – 2006 May. – Vol. 7, N 5. – P. 379–391.
  19. Immunotoxin BL22 induces apoptosis in mantle cell lymphoma (MCL) cells dependent on Bcl-2 expression / C. Bogner [et al.] // Br. J. Haematol. – 2010 Jan. – Vol. 148, N 1. – P. 99–109.
  20. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / под ред. З. П. Софьиной [и др.]. – М. : Медицина, 1980. – 296 с.
  21. Пат. 2388064 Российская Федерация. Способ воспроизведения злокачественного процесса в эксперименте, МПК G 09 B 23/28 / Ю. С. Сидоренко, Е. М. Франциянц, Л. Д. Ткаля ; заявитель и патентообладатель Ростов. науч.-исслед. онкол. ин-т Росмедтехнологий. – № 2008133088/14 ; заявл. 11.08.08 ; опубл. 27.04.10, Бюл. № 12. – 7 с.
  22. Пат. 19417 Респ. Беларусь. Способ соно-фотодинамической терапии перевитой подкожно глиомы C6 у крысы, МПК А 61 N 5/067, А 61 N 7/00 / Ю. П. Истомин, Е. Н. Александрова, В. Н. Чалов, Д. А. Церковский ; заявитель и патентообладатель Респ. науч.-практ. центр онкологии и мед. радиологии им. Н. Н. Александрова. – № a20120970 ; заявл. 27.06.12 ; опубл. 28.02.14.
  23. Фадеева, Е. В. Экспериментальная модель меланомы B16 и методы иммунотерапии / Е. В. Фадеева // Междунар. журн. эксперим. образования. – 2010. – № 8. – С. 49–50.
  24. Single-chain antibody-based immunotoxins targeting Her2/neu: design optimization and impact of affinity on antitumor efficacy and off-target toxicity / Y. Cao [et al.] // Mol. Cancer. Ther. – 2012 Jan. – Vol. 11, N 1. – P. 143–153.
  25. Choudhary, S. Therapeutic potential of anticancer immunotoxins / S. Choudhary, M. Mathew, R. S. Verma // Drug. Discov. Today. – 2011 Jun. – Vol. 16, N 11/12. – P. 495–503.
  26. Сенькова, А. В. Структурные изменения в опухоли и печени мышей при нарастании множественной лекарственной устойчивости перевиваемой лимфосаркомы RLS40 в условиях полихимиотерапии : дис. ... канд. мед. наук : 14.03.02 / А. В. Сенькова. – Новосибирск, 2010. – 140 с.
  27. Christensen, J. Non-Invasive In Vivo Imaging and Quantification of Tumor Growth and Metastasis in Rats Using Cells Expressing Far-Red Fluorescence Protein / J. Christensen, D. Vonwil, V. P. Shastri // PLoS One. – 2015 Jul. – Vol. 10, N 7. – P. e0132725.
  28. Киреева, Г. С. Внутривенное химиоперфузионное лечение диссеминированного рака яичника в эксперименте : дис. ... канд. биол. наук : 14.01.12 / Г. С. Киреева. – СПб., 2015. – 124 с.
  29. Non-invasive intravital imaging of cellular differentiation with a bright red-excitable fluorescent protein / J. Chu [et al.] // Nat. Methods. – 2014 May. – Vol. 11, N 5. – P. 572–578.
  30. Intratumor heterogeneity: nature and biological significance / T. S. Gerashchenko [et al.] // Biochemistry (Mosc.). – 2013 Nov. – Vol. 78, N 11. – P. 1201–1215.
  31. Способ моделирования лимфогенного и гематогенного метастазирования мышинной меланомы B16 у крыс / О. И. Кит [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2017. – Т. 163, № 6. – С. 759–762.
  32. Изучение эффективности новой фармацевтической композиции дииндолметана в отношении подавления ксенотрансплантатов опухолей эндометрия [Электронный ресурс] / В. И. Киселев [и др.] // Медицина и образование в Сибири. – 2014. – № 5. – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/izuchenie-effektivnosti-novoy-farmatsevticheskoy-kompozitsii-diindolimetana-v-otnoshenii-podavleniya-ksenograftov-opuholey>. – Дата доступа: 19.11.2018.
  33. Соколова, Е. А. Флуоресцирующая модель HER2-гиперэкспрессирующей опухоли яичника человека и ее использование для оценки эффективности таргетного иммунотоксина на основе экзотоксина А : дис. ... канд. биол. наук : 03.01.02 / Е. А. Соколова. – М., 2016. – 134 с.

Поступила 03.05.2018 г.

Принята в печать 29.11.2018 г.

## References

1. Timofeevskiy AD, red. Models and methods of experimental Oncology: prakt posobie. Moscow, RF: Medgiz; 1960. 246 p. (In Russ.)
2. Popova NA. Models of experimental Oncology. Sorosov Obshcheobrazovat Zhurn. 2000;6(8):33-8. (In Russ.)
3. Oncology news. Alloncology.com: [sait]. Moscow, RF; 2009-2011. Rezhim dostupa: <http://alloncology.com/articles/7/5/>. Data dostupa: 30.06.2018. (In Russ.)
4. Markov AV. Spectrum of biological activity of new derivatives of glycyrrhetic acid and molecular mechanisms of their action: avtoref dis ... kand biol nauk: 03.01.04. Novosibirsk, RF; 2015. 22 p. (In Russ.)
5. Ergazina MZh, Dzhangeldina ZN, Krasnoshtanov AV, Krasnoshtanov VK. Structural changes in the thymus of laboratory rats in the development of graft and spontaneous tumors. Vestn KazNMU. 2016;(4):287-92. (In Russ.)
6. Kunts TA, Vakulin GM, Ovsyanko EV, Efremov AV. Liver of rats at advanced stages of development of carcinosarcoma Walker 256. Vestn NGU Ser Biologiya Klin Meditsina. 2011;9(vyp 2):126-9. (In Russ.)
7. Lebedinskaya OV, Kiselevskiy MV, Lebedinskaya EA, Donenko FV, Bolotova EI, Buranova TYu, i dr. Morphological features of mouse liver with metastatic tumor process. Sovremen Naukoem Tekhnologii. 2006;(5):32-3. (In Russ.)
8. Dzhadranov ES, Ergazina MZh, Dzhangeldina ZN, Krasnoshtanov AV. Structural changes in perelivnoj experimental tumors of rat lymphosarcoma after treatment with cyclophosphamide. Vestn KazNMU. 2015;(3):213-5. (In Russ.)
9. Korochkin RB, Verbitskiy AA, Aleshkevich VN, Sandul AV. Cultivation of viruses in cell cultures: ucheb-metod posobie. Vitebsk, RB: VGAVM; 2010. 43 p. (In Russ.)
10. Tillmann T, Kamino K, Mohr U. Incidence and spectrum of spontaneous neoplasms in male and female CBA/J mice. Exp

- Toxicol Pathol. 2000 Jun;52(3):221-5. doi: 10.1016/S0940-2993(00)80032-9
11. Reshetov IV, Daykhes NA, Karkishchenko NN, Strel'tsova EA, Stepanov SO, Semenov KhKh, i dr. Experimental model of head and neck tumor for potential targeted therapy. *Sib Onkol Zhurn.* 2009;(5):43-8. (In Russ.)
12. Gol'dberg VE, Matyash MG. Modern achievements of drug therapy of malignant neoplasms. *Biul SO RAMN.* 2004;(2):36-40. (In Russ.)
13. Kaledin VI, Popova HA, Andreeva EM. Study of the effectiveness of mono-and polychemotherapy on the model of mouse lymphosarcoma, insensitive to the induction of apoptosis. *Vopr Onkologii.* 2006;52(1):70-3. (In Russ.)
14. Kaledin VI, Nikolin VP, Ageeva TA, Timofeeva OA, Filipenko ML, Ronichevskaia GM, i dr. Cyclophosphamide induced apoptosis of murine lymphosarcoma cells in vivo. *Vopr Onkologii.* 2000;46(5):588-93. (In Russ.)
15. Mironova N, Shklyayeva O, Andreeva E, Popova N, Kaledin V, Nikolin V, et al. Animal model of drug-resistant tumor progression. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Dec;1091:490-500. doi: 10.1196/annals.1378.090
16. Andreeva EM, Mironova NL, Shklyayeva OA, Popova NA, Zenkova MA. Participation of genes *mdr1*, *mrp1*, *p53* and *bcl-2* in the formation of resistance of mouse lymphosarcoma LS cells to the therapeutic action of cyclophosphane. *Vestn NGU Ser Biologiya Klin Meditsina.* 2006;4(vyp 1):21-6. (In Russ.)
17. Gershanovich ML, Filov VA, Akimov MA, Akimov AA. Introduction to chemotherapy of malignant tumors. Saint-Petersburg, RF: Sotsis; 1999. 143 p. (In Russ.)
18. Pfreundschuh M, Trümper L, Osterborg A, Pettengell R, Tmenny M, Imrie K, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good prognosis diffuse large-B-cell lymphoma : a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol.* 2006 May;7(5):379-91. doi: 10.1016/S1470-2045(06)70664-7
19. Bogner C, Dechow T, Ringshausen I, Wagner M, Oelsner M, Lutzny G, et al. Immunotoxin BL22 induces apoptosis in mantle cell lymphoma (MCL) cells dependent on Bcl-2 expression. *Br J Haematol.* 2010 Jan;148(1):99-109. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07939.x
20. Sof'ina 3P, Syrkn AB, Goldin A, Klyayn A, red. Experimental evaluation of anticancer drugs in the USSR and the USA. Moscow, RF: Meditsina; 1980. 296 p. (In Russ.)
21. Sidorenko YuS, Frantsiyants EM, Tkalya LD; zaiavitel' i patentoobladatel' Rostov nauch-issled onkol in-t Rosmedtekhologii. Pat 2388064 Rossiiskaia Federatsiia, MPK G 09 B 23/28. The method of playing a malignant process in the experiment. № 2008133088/14; zaiavl 11.08.08; opubl 27.04.10, Biul № 12. 7 p. (In Russ.)
22. Istomin YuP, Aleksandrova EN, Chalov VN, Tserkovskiy DA; zaiavitel' i patentoobladatel' Resp nauch-prakt tsentr onkologii i med radiologii im NN Aleksandrova. Pat 19417 Resp Belarus'. Method of sono-photodynamic therapy of subcutaneous C6 glioma in rats, MPK A 61 N 5/067, A 61 N 7/00. № a20120970; zaiavl 27.06.12; opubl 28.02.14. (In Russ.)
23. Fadeeva EV. Experimental model of melanoma B16 and immunotherapy methods. *Mezhdunar Zhurn Eksperim Obrazovaniia.* 2010;(8):49-50. (In Russ.)
24. Cao Y, Marks JD, Huang Q, Rudnick SI, Xiong C, Hittelman WN, et al. Single-chain antibody-based immunotoxins targeting Her2/neu: design optimization and impact of affinity on antitumor efficacy and off-target toxicity. *Mol Cancer Ther.* 2012 Jan;11(1):143-53. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0519
25. Choudhary S, Mathew M, Verma RS. Therapeutic potential of anticancer immunotoxins. *Drug Discov Today.* 2011 Jun;16(11-12):495-503. doi: 10.1016/j.drudis.2011.04.003
26. Sen'kova AV. Structural changes in the tumor and liver of mice with the increase of multiple drug resistance of transplanted lymphosarcoma RLS40 under polychemotherapy: dis ... kand med nauk: 14.03.02. Novosibirsk, RF; 2010. 140 p. (In Russ.)
27. Christensen J, Vonwil D, Shastri VP. Non-Invasive In Vivo Imaging and Quantification of Tumor Growth and Metastasis in Rats Using Cells Expressing Far-Red Fluorescence Protein. *PLoS One.* 2015 Jul 17;10(7):e0132725. doi: 10.1371/journal.pone.0132725
28. Kireeva GS. Intraperitoneal chemoperfusion treatment of disseminated ovarian cancer in experiment: dis ... kand biol nauk: 14.01.12. Saint-Petersburg, RF; 2015. 124 p. (In Russ.)
29. Chu J, Haynes RD, Corbel SY, Li P, González-González E, Burg JS, et al. Non-invasive intravital imaging of cellular differentiation with a bright red-excitable fluorescent protein. *Nat Methods.* 2014 May;11(5):572-8. doi: 10.1038/nmeth.2888
30. Gerashchenko TS, Denisov EV, Litviakov NV, Zavyalova MV, Vtorushin SV, Tsyganov MM, et al. Intratumor heterogeneity: nature and biological significance. *Biochemistry (Mosc).* 2013 Nov;78(11):1201-15. doi: 10.1134/S0006297913110011
31. Kit OI, Kaplieva IV, Frantsiyants EM, Trepitaki LK. Method for modeling lymphogenic and hematogenous metastasis of murine melanoma B16 in rats. *Biul Eksperim Biologii Meditsiny.* 2017;163(6):759-62. (In Russ.)
32. Kiselev VI, Drukh VM, Kuznetsov IN, Muzyzhnek EL, Pchelintseva OI. A study of the effectiveness of the new pharmaceutical compositions diindolylmethane regarding suppression of xenograft tumors of the endometrium [Elektronnyi resurs]. *Meditsina i obrazovanie v Sibiri.* 2014;(5). Rezhim dostupa: <https://cyberleninka.ru/article/n/izuchenie-effektivnosti-novoy-farmatsevticheskoy-kompozitsii-diindolilmetana-v-otnoshenii-podavleniya-ksenograftov-opuholey>. Data dostupa: 19.11.2018. (In Russ.)
33. Sokolova EA. The fluorescent model of HER2-hyperexpression tumors human ovaries and its use to assess the effectiveness of targeted immunotoxin on the basis of exotoxin A: dis ... kand biol nauk: 03.01.02. Moscow, RF; 2016. 134 p. (In Russ.)

Submitted 03.05.2018

Accepted 29.11.2018

**Сведения об авторах:**

Побяржин В.В. – к.б.н., доцент, докторант кафедры инфекционных болезней, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;

Пашинская Е.С. – к.б.н., доцент, докторант кафедры инфекционных болезней, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;

Семенов В.М. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;

Гончаров А. Е. – к.м.н., заведующий лабораторией иммунологии и клеточной биотехнологии, Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.

**Information about authors:**

*Pabiarzhyn V.V. – Candidate of Biological Sciences, associate professor, doctoral candidate of the Chair of Infectious Diseases, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;*

*Pashinskaya E.S. – Candidate of Biological Sciences, associate professor, doctoral candidate of the Chair of Infectious Diseases, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;*

*Semenov V.M. – Doctor of Medical Sciences, professor, head of the Chair of Infectious Diseases, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;*

*Hancharou A.Y. – Candidate of Medical Sciences, head of the Immunology and Cell Biotechnology Laboratory, Republican Practical-Scientific Centre of Epidemiology & Microbiology.*

**Адрес для корреспонденции:** Республика Беларусь, 210009, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, кафедра инфекционных болезней. E-mail: tulovo22@rambler.ru – Побяржин Вячеслав Войтехович.

**Correspondence address:** Republic of Belarus, 210009, Vitebsk, 27 Frunze ave., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Chair of Infectious Diseases. E-mail: tulovo22@rambler.ru – Vyacheslav V. Pobyarzhin.